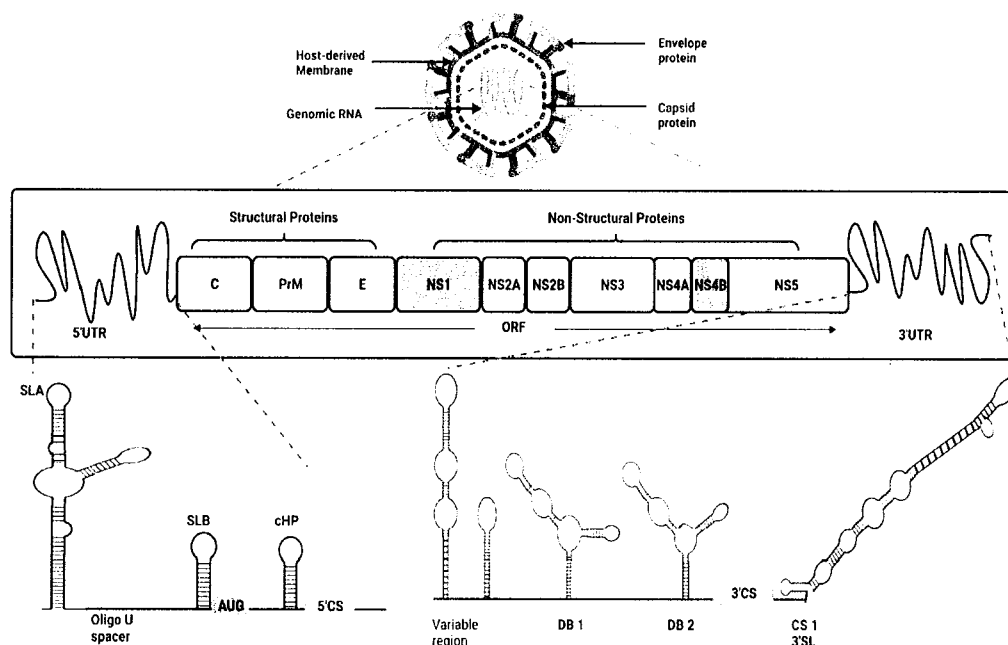


Document 1 : Organisation du génome du virus de la dengue.



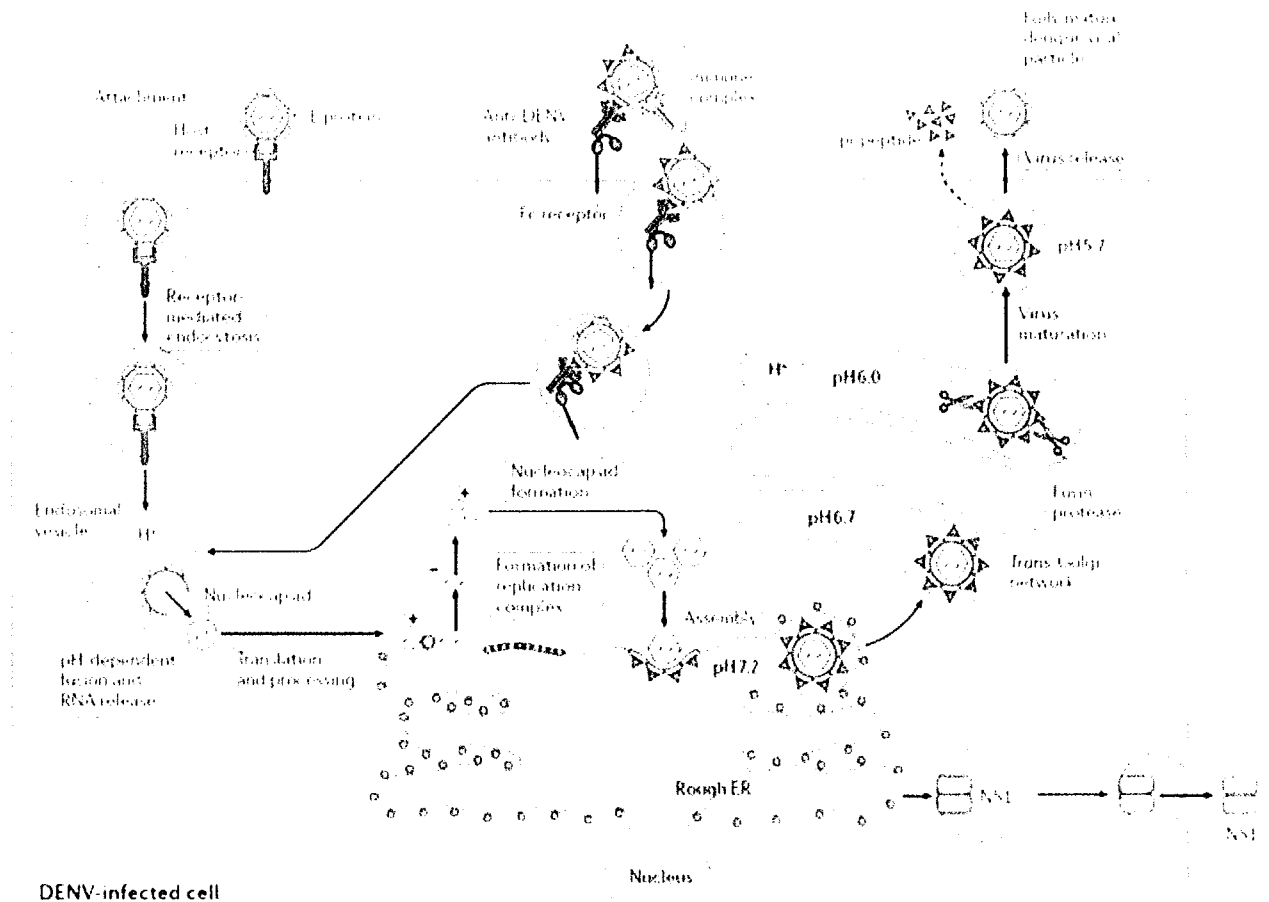
Le génome viral est constitué d'une extrémité 5'-UTR (région non traduite localisée en 5'), d'une séquence ORF (cadre ouvert de lecture), et d'une extrémité 3'-UTR (région non traduite localisée en 3').

La séquence ORF sert de matrice pour la traduction de 3 protéines structurales (C - Capside, PrM - Pré-Membrane et E - Enveloppe) et de 7 protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5).

Les séquences aux extrémités 5'-UTR et 3'UTR sont essentielles. En effet, elles interviennent dans la circularisation du génome, qui est une étape importante lors de la réplication et de l'expression du génome.

(<https://www.mdpi.com/1999-4915/13/10/1967>)

Document 2 : Cycle de multiplication du virus de la dengue



L'entrée du virus dans la cellule hôte est permise par endocytose médiée par des récepteurs. Il y a ensuite libération du génome viral de la nucléocapside et prise en charge de l'acide nucléique par la machinerie cellulaire pour la traduction d'une polyprotéine, qui par autocatalyse, libère les nombreuses protéines virales.

Le génome viral est répliqué dans le cytoplasme cellulaire et un autoassemblage de nouvelles particules virales est alors possible au sein du Reticulum Endoplasmique Rugueux (RER). Les particules empruntent ensuite l'appareil de Golgi pour être exocytées par la cellule hôte.

Une protéine virale, NS1, s'associe avec le RER pour être ensuite directement libérée par la cellule hôte.

(D'après *Dengue infection – Nature review disease primers* - 2016 : <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2016.55>)

Document 3 : Le microscope à force atomique

3A : Principe du microscope à force atomique :

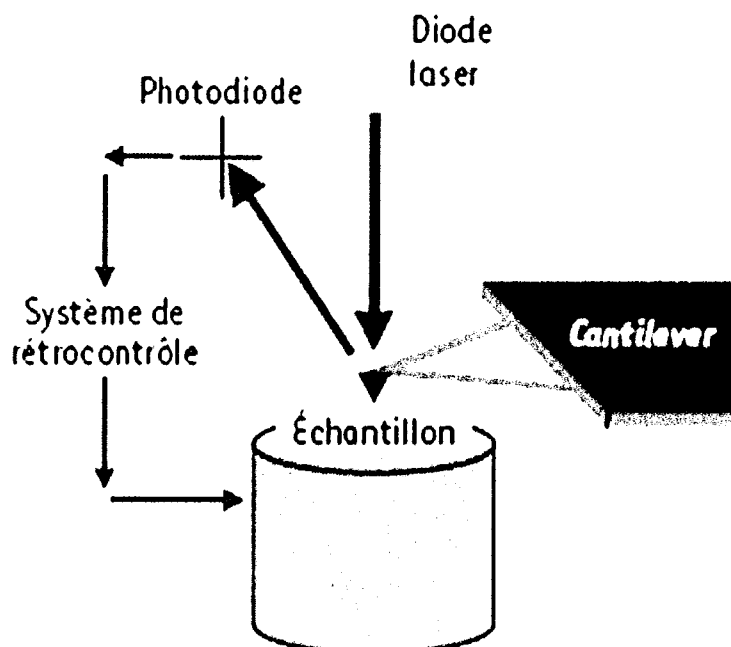
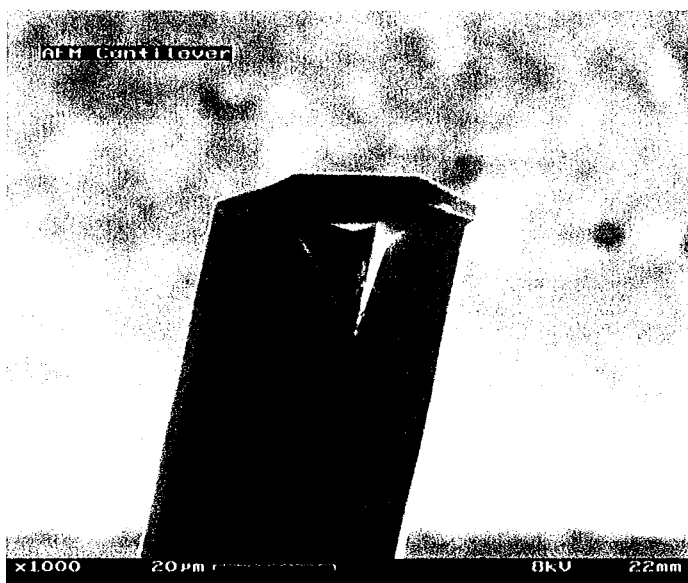


Schéma de principe et équipement courant de microscopie à force atomique (AFM). Un faisceau laser dirigé sur l'extrémité du *cantilever* est réfléchi vers une photodiode. Les déplacements du faisceau sur la photodiode permettent de détecter les mouvements du *cantilever*. Le positionnement dans les trois plans de l'espace (x, y, z), avec une précision voisine de la taille de l'atome, de la pointe par rapport à l'échantillon durant le balayage est assuré par des céramiques piézo-électriques. Le système est piloté par un ordinateur qui reconstitue les informations recueillies par la pointe sous forme d'images 3-D.

(https://www.medecinesciences.org/en/articles/medsci/full_html/2003/01/medsci2003191p92/medsci2003191p92-fig1.jpg)

3B : Électronographie d'un *cantilever* au microscope électronique à balayage :

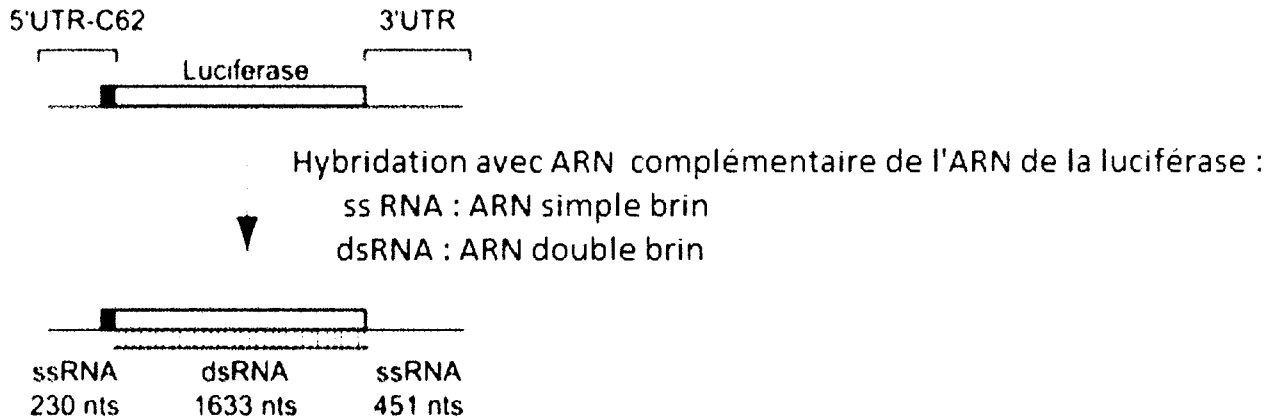


(<https://culturesciences.chimie.ens.fr/thematiques/chimie-analytique/la-microscopie-a-force-atmique-pour-l-observation-de-molecules-avec>)

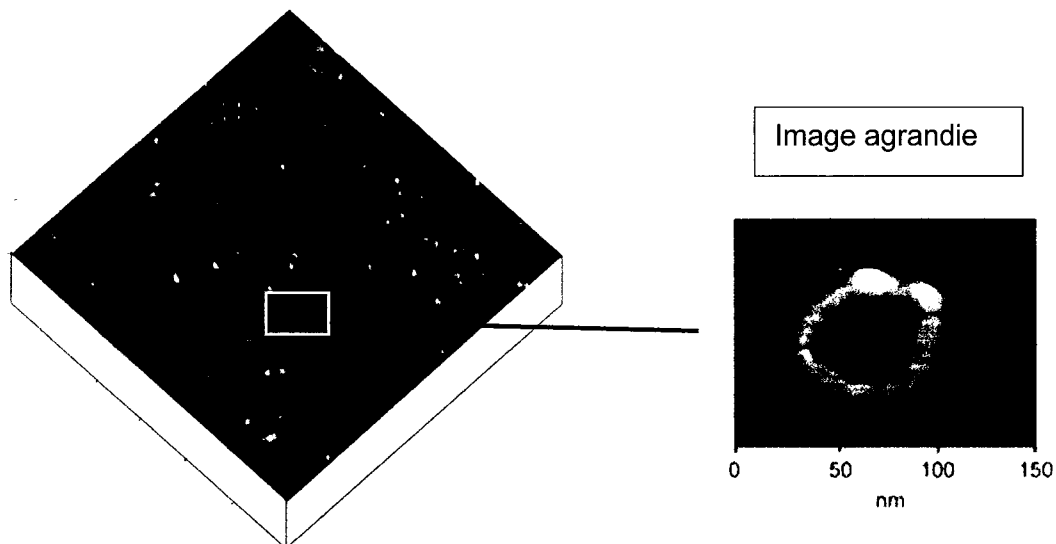
Document 4 : Observation de la circularisation de l'ARN viral de la dengue par AFM :

4A : Construction par biologie moléculaire :

Les séquences 5'UTR et 3'UTR du virus de la dengue ont été fusionnées à l'ARN de la luciférase (choisie uniquement pour sa grande taille). L'ARN obtenu est hybridé à la séquence de la luciférase comme schématisé ci-dessous.



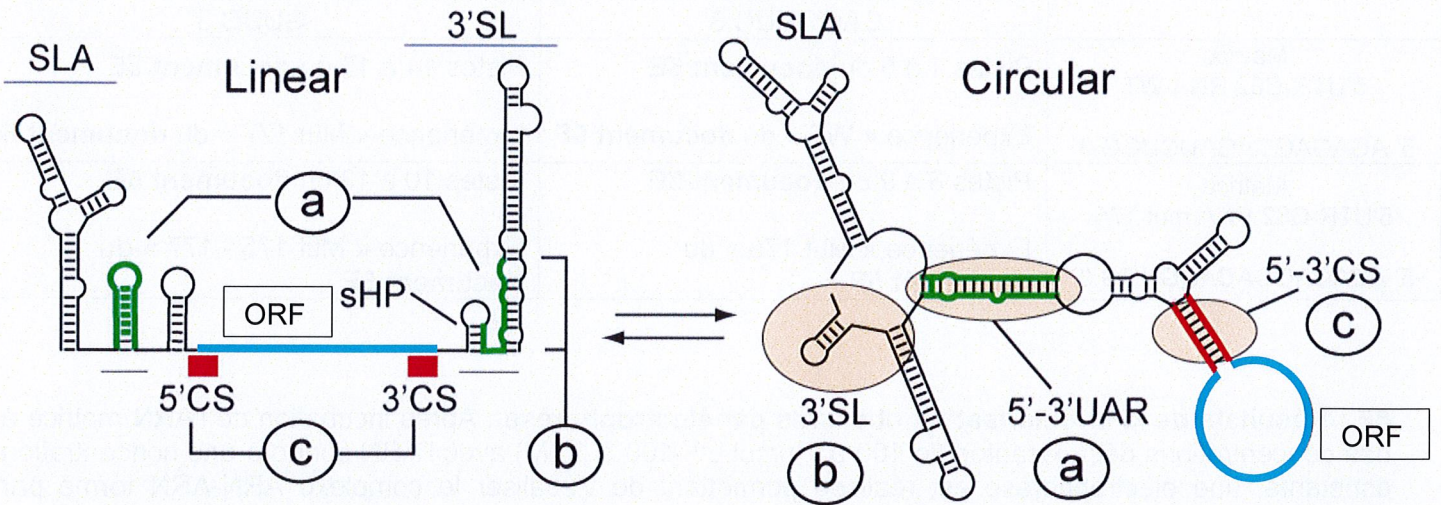
4B : Observation des ARN



[\(https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1112138/\)](https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1112138/)

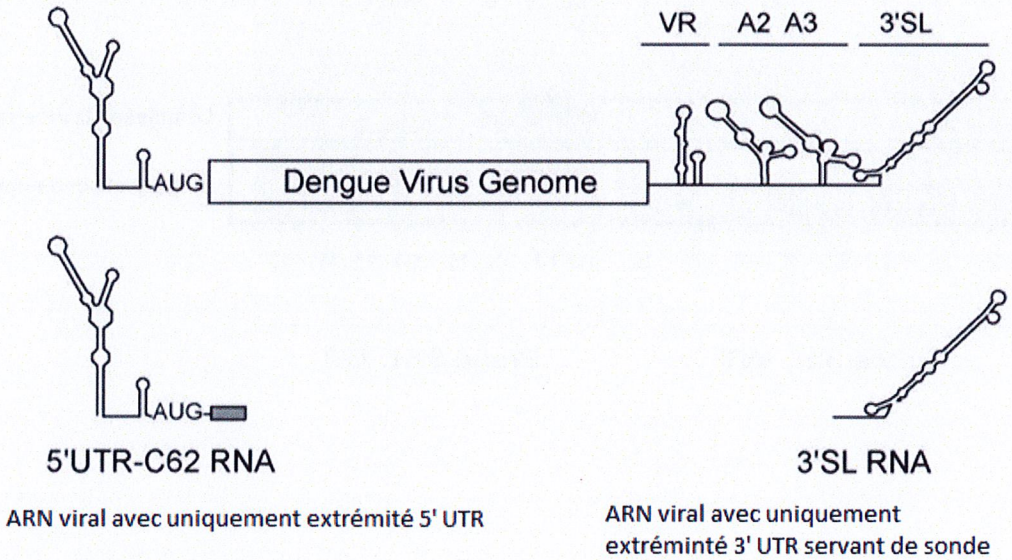
Document 5 : Rôle des extrémités UTR de l'ARN viral :

5A : Représentation schématique du génome du virus de la dengue linéaire et circularisé : la circularisation de l'ARN viral entraîne une réorganisation des régions représentées en vert et en rouge.



5B : Représentation détaillée des extrémités 5'UTR et 3'UTR du génome viral : A partir du génome ARN complet du virus, il est possible d'obtenir les deux extrémités UTR :

- Extrémité 5' UTR appelée **5'UTR-C62 RNA** qui servira de **matrice**
- Extrémité 3'UTR appelée **3'SL** qui servira de **sonde**



5C : Mutations : des mutations peuvent être introduites dans le génome viral. Ces mutations peuvent influencer la circularisation de l'ARN viral :

- L'**ARN viral non muté** est désigné comme le type sauvage (**WT : wild type**)
- Une mutation a été choisie au niveau :
 - de la matrice (5'UTR-C62 RNA) : mutation 175 (mut 175)

	Séquence
5' UTR-C62 RNA WT	5' AGAGAGCAGAUUCUCG 3'
5' UTR-C62 RNA Mut 175	5' ACAGAGCACAUGUCG 3'

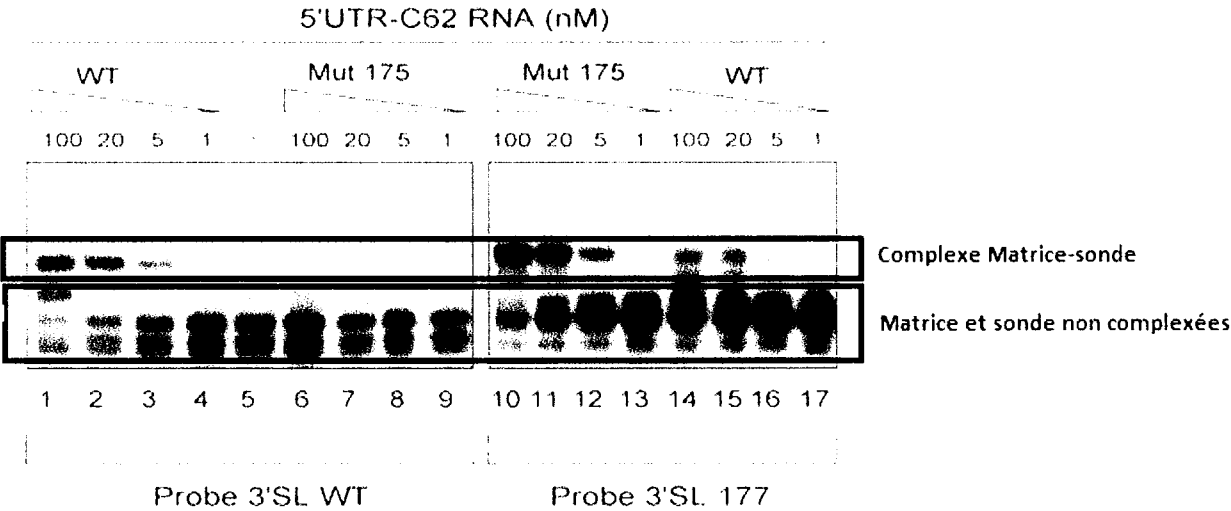
- de la sonde (3'SL) : mutation 177 (mut 177)

	Séquence
3' SL WT	5' CGAGAUCUGCUCUCUAAUCAACAGGUUC 3'
3' SL Mut 177	5' CCAGAUGUGCUCUGUAAUCAACACGUUC 3'

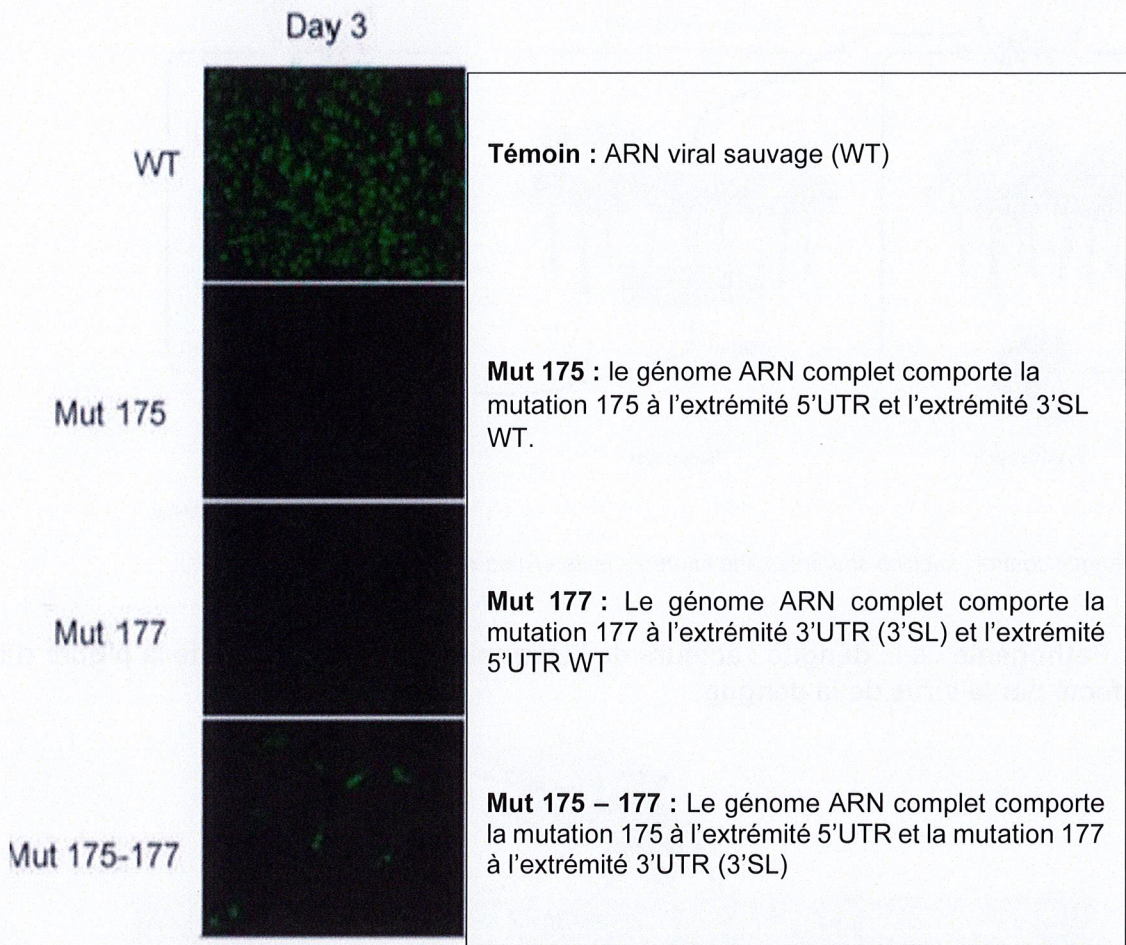
5D : Plans des expériences pour la circularisation du génome viral (document 5E) et l'expression protéique virale (document 5F) :

	Sonde 3'SL WT	Sonde 3'SL mutée 177
	5' CGAGAUCUGCUCUCUAAUCAA CAGGUUC 3'	5' CCAGAU G UGCUCUGUAAUCAACAC GUUC 3'
Matrice 5'UTR-C62 RNA WT 5' AGAGAGCAGAUCUCG 3'	Pistes 1 à 5 du document 5E Expérience « WT » du document 5F	Pistes 14 à 17 du document 5E Expérience « Mut 177 » du document 5F
Matrice 5'UTR-C62 RNA mut 175 5' ACAGAGCACAUGUCG 3'	Pistes 6 à 9 du document 5E Expérience « Mut 175 » du document 5F	Pistes 10 à 13 du document 5E Expérience « Mut 175 - 177 » du document 5F

5E : Résultats de la circularisation observés par électrophorèse : Après incubation de l'ARN matrice à des concentrations décroissantes de 100 à 1 nmol.L⁻¹ (100 à 1 nM) avec l'ARN sonde à une concentration constante, une électrophorèse est réalisée permettant de visualiser le complexe ARN-ARN formé par l'hybridation entre la matrice et la sonde.

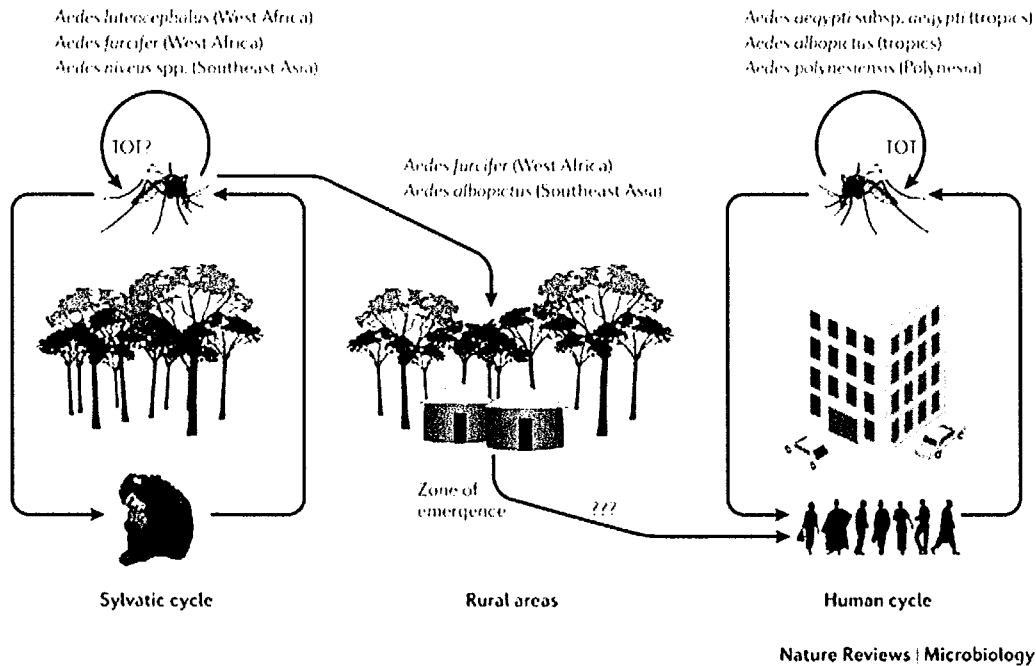


5F : L'expression de protéines du virus de la dengue dans des cellules : on introduit des ARN viraux complets de type sauvage et mutés dans des cellules. La circularisation de l'ARN viral dans les cellules permet la synthèse des protéines virales. Après 3 jours de culture, l'expression des protéines est révélée par immunofluorescence à l'aide d'anticorps marqués, le complexe immunitaire formé par les protéines virales et l'anticorps marqué est visible par une fluorescence verte.



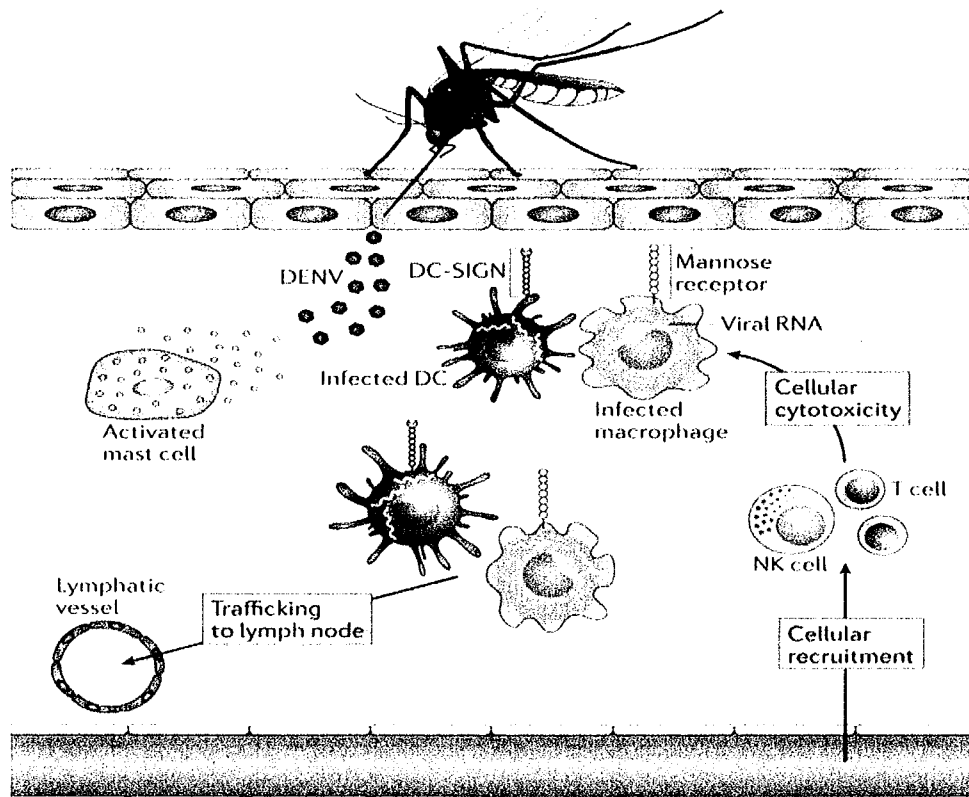
(<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1112138/>)

The transmission cycles of dengue virus.



(Approaches of dengue control : vaccine strategies and future aspects - Runa Akter)

Document 7 : Pathogénie de la dengue : acteurs de l'immunité intervenant lors de la piqûre d'un moustique infecté par le virus de la dengue



DC : Dendritic Cell.

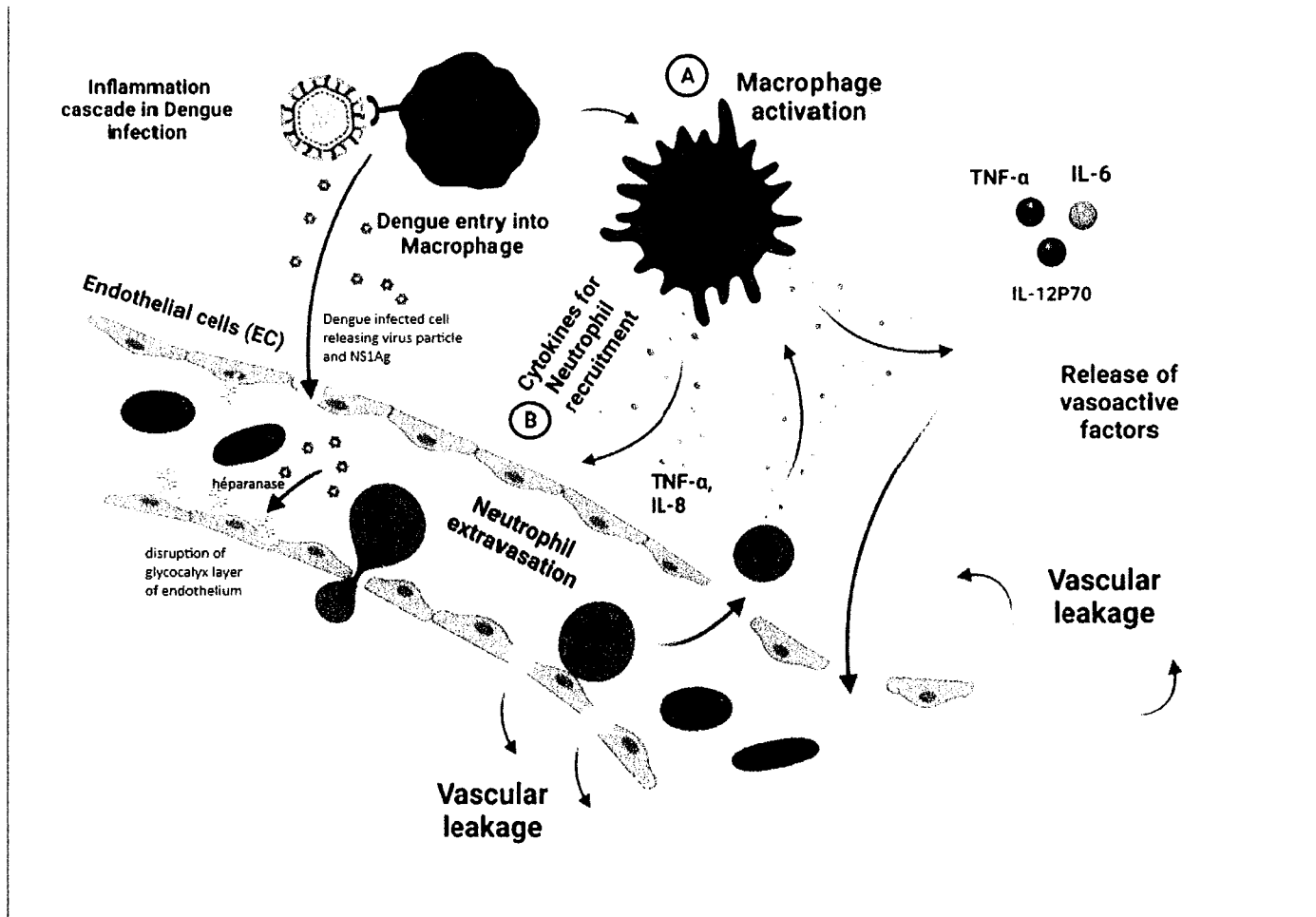
DC-SIGN, Mannose receptor : récepteurs au virus.

Lymph node : ganglion lymphatique

Nature Reviews | Microbiology

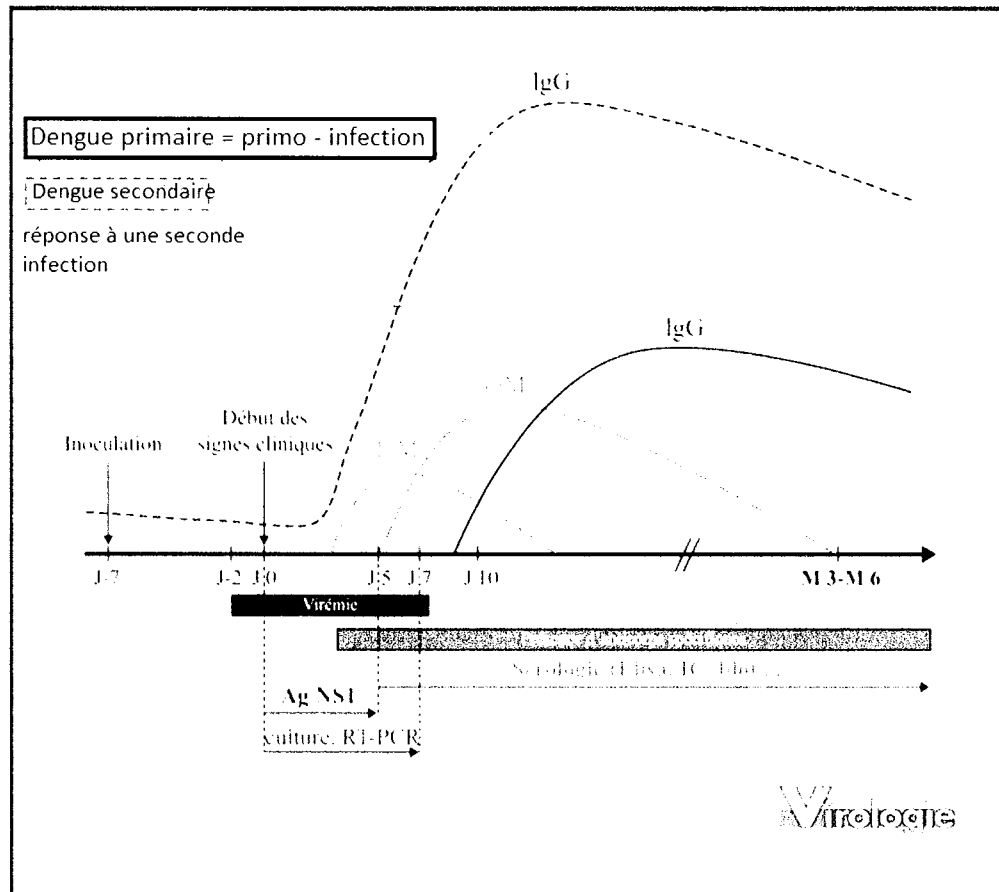
(Soni S, Gill V, . A, et al. (July 11, 2023) Dengue, Chikungunya, and Zika: The Causes and Threats of Emerging and Re-emerging Arboviral Diseases. Cureus 15(7): e41717. doi:10.7759/cureus.41717)

Document 8 : Réponse inflammatoire au cours d'une infection par le virus de la dengue



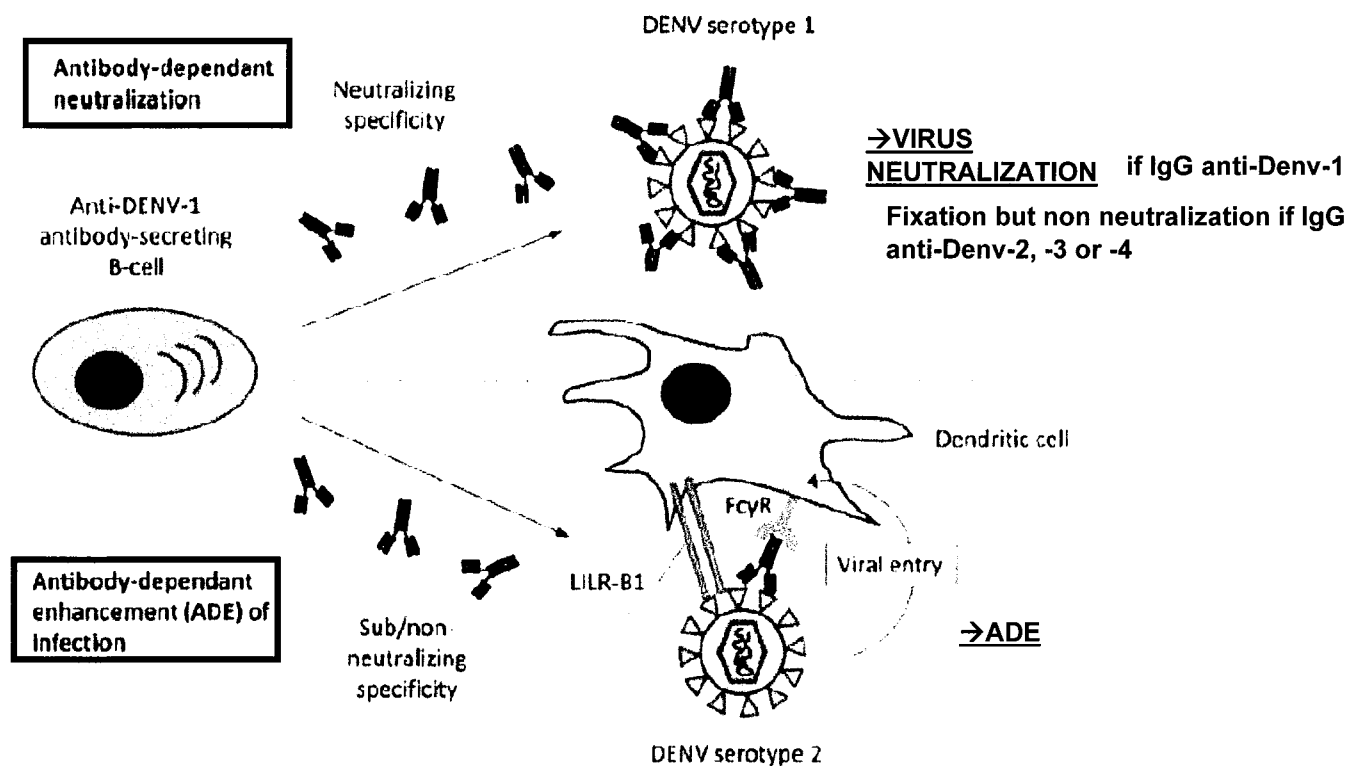
(Modifié d'après Viruses -2021)

Document 9 : Cinétique d'apparition des anticorps aux cours de l'infection par la dengue



Source : Najjoulah *et al.*, 2012

Document 10 : Les mécanismes d'amplification intrinsèque dépendante des anticorps (ADE)



(Modifié d'après <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04674471v1>)

Document 11 : Carte de test rapide Agappe AG-Q Dengue NS1

Composition de la bande test :

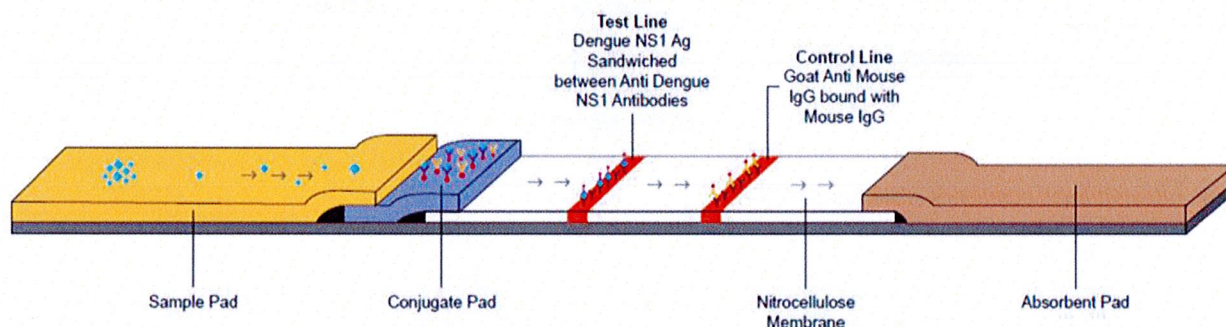
Pour la réaction de la bande de test, une concentration de 1,25 mg/mL d'anticorps de capture anti-dengue NS1a été directement appliquée sur la membrane de nitrocellulose et un anticorps détecteur anti-dengue NS1 conjugué à des nanoparticules d'or a été appliqué sur le tampon de conjugué.

Pour la réaction de la bande de contrôle, l'IgG de chèvre anti-souris et l'IgG de souris conjuguée à l'or colloïdal ont été utilisés comme anticorps de capture et de détection respectivement. Le système de membrane comprend un alignement superposé d'un tampon d'échantillon, d'un tampon de conjugué, d'une membrane de nitrocellulose et d'un tampon absorbant.

Réalisation du test

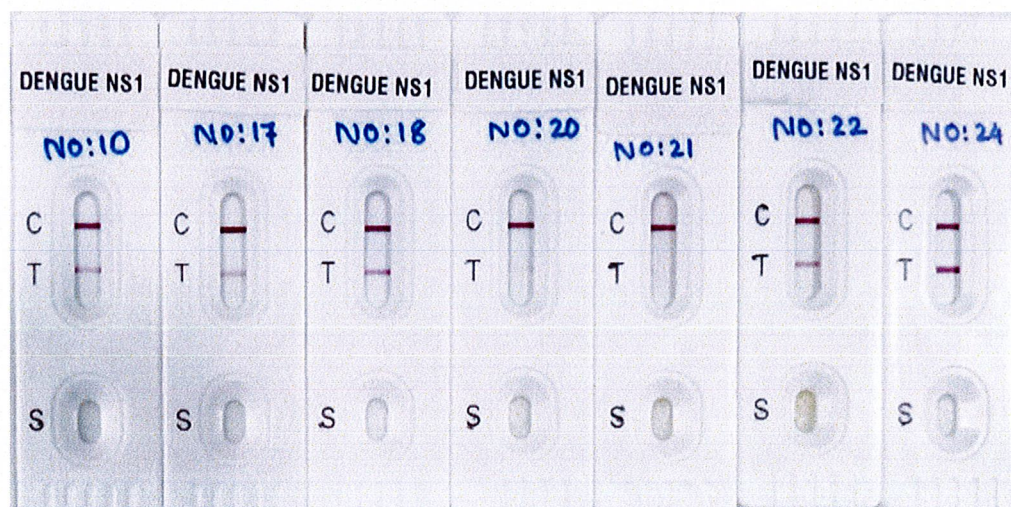
Pour réaliser le test, 75 µL d'échantillon de sérum/plasma/sang total sont administrés dans la fenêtre d'échantillon de la bandelette de test. Pour l'échantillon de sang total, 1 goutte (40 µL) de tampon de lyse est ajoutée à 75 µL de l'échantillon. En raison de l'action capillaire, le sang s'écoule du tampon d'échantillon vers le tampon absorbant à travers le tampon conjugué et la membrane de nitrocellulose où une réaction antigène-anticorps se produit (**Document 11A**). Un échantillon positif à la dengue entraîne la formation d'une bande de couleur rouge dans la ligne de test et la ligne de contrôle dans un délai de 2 à 10 minutes tandis qu'un échantillon négatif à la dengue produit une bande de couleur rouge uniquement dans la ligne de contrôle.

11 A. organisation de la carte de test

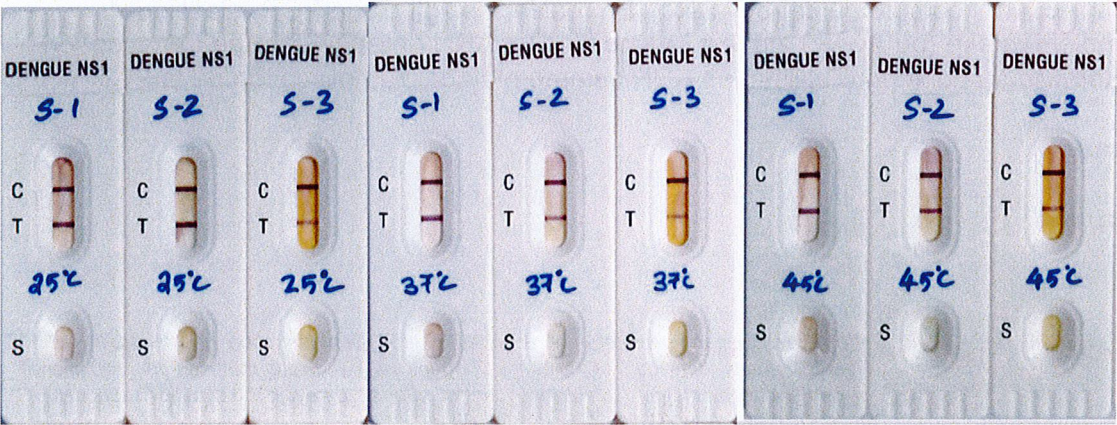


La ligne de test correspond à la réaction immunologique en sandwich entre l'antigène NS1 et les paires d'anticorps monoclonaux anti-NS1, dont un est couplé à une particule colorée. La ligne de contrôle correspond à la réaction immunologique entre un anticorps primaire et un anticorps secondaire, à savoir l'IgG de souris et l'IgG de chèvre anti-souris couplée à une particule colorée.

11 B. Résultats de plusieurs tests NS1 :

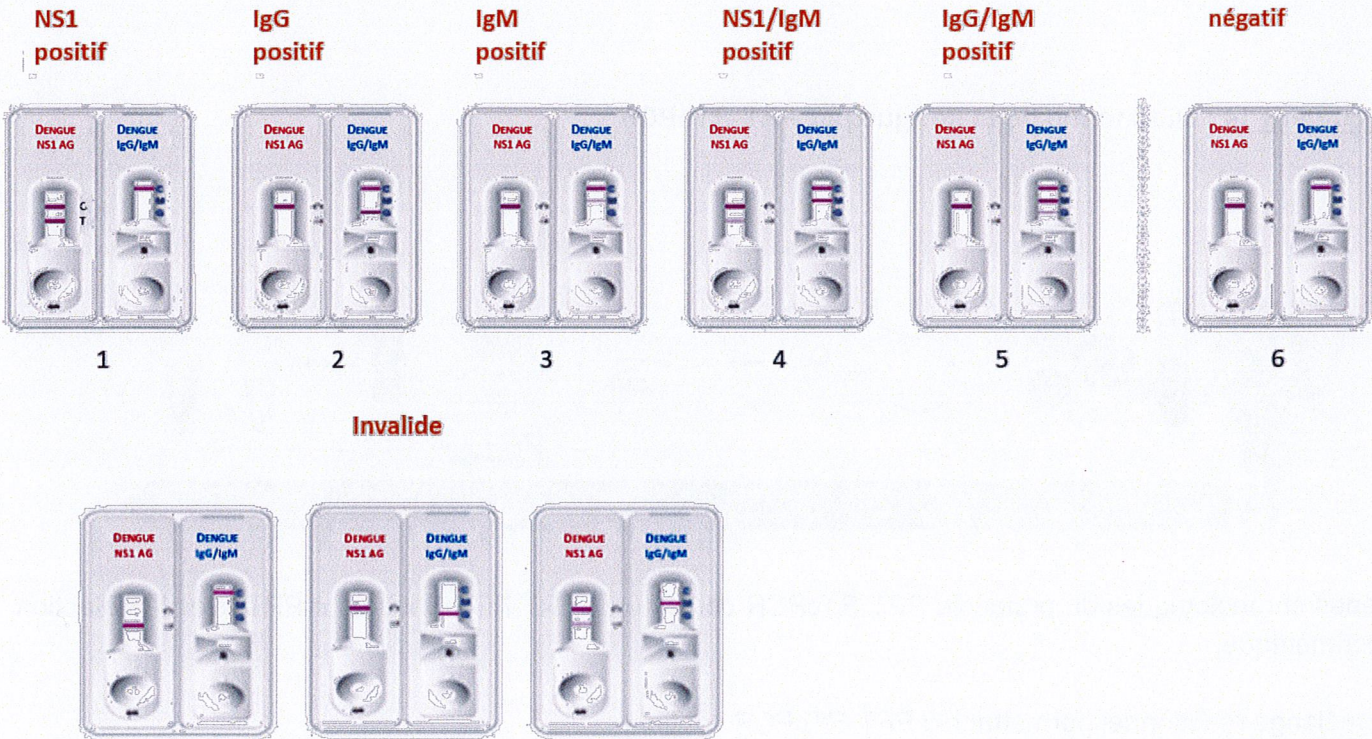


11 C. Les résultats de l'étude de stabilité accélérée ont montré des intensités de bande égales dans les bandes de tests et de contrôle après exposition à des conditions extrêmes.



(Diagnostic accuracy of Dengue NS1 lateral flow immunoassay in comparison to reverse transcriptase polymerase chain reaction and enzyme linked Immunosorbent Assay(Ajaikumar Sukumaran 1,* , R. Arun Krishnan , Dhanesh Mandam Kulathil , P.R. Haritha , T.N. Varun , Biby T. Edwin, K.V. Sarath , Jofy K. Paul , C.S. Satheesh Kumar, D.M. Vasudevan)

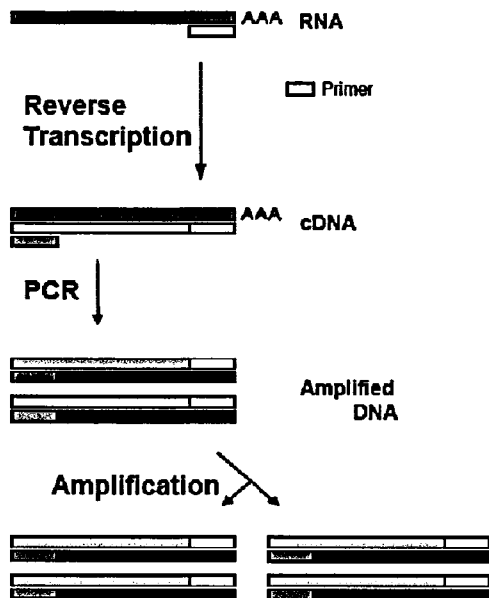
Document 12 : TDR combiné AgNS1-IgM/IgG Bioline interprétation



(D'Après -.Les tests de diagnostic rapide dans le diagnostic des arboviroses - Laurence Fagour, Cristina Santamaria, Raymond Césaire)

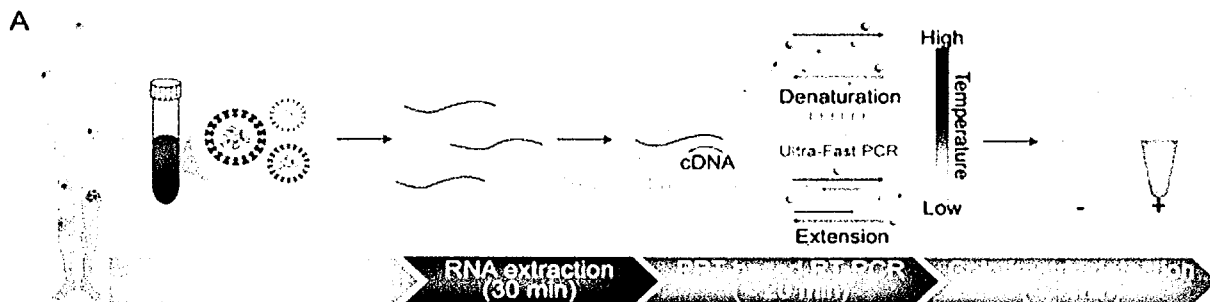
Document 13 : Principe d'une RT- PCR

L'acronyme **RT-PCR** signifie *Reverse Transcriptase* PCR, soit une PCR après transcription inverse d'un acide ribonucléique (ARN) en ADN complémentaire (ADNc). En réalité, il s'agit d'une PCR "classique" réalisée sur un ADN complémentaire (ou ADNc), qui est une copie d'un ARN obtenue par une transcription inverse. La RT-PCR a été mise au point pour utiliser les ARN comme matrice d'amplification de la PCR.



https://www.researchgate.net/publication/248399157_Demonstration_and_feasibility_of_RT_PCR_and_immune_detection_of_human_pathogens_as_candidate_methods_for_compliance_control_and_requirements_for_compliance_control_efforts?_tp=eyJjb250ZXh0Ijp7ImZpcnN0UGFnZSI6I6I9kaXJIY3QiLCJwYXWdllojoiX2RpcmVjdCJ9fQ

Document 14 : Diagnostic de la dengue par PPT-RTcPCR



Étapes chronologiques du protocole PPT-RTcPCR combinant la RT-PCR basée sur PPT avec la détection colorimétrique.

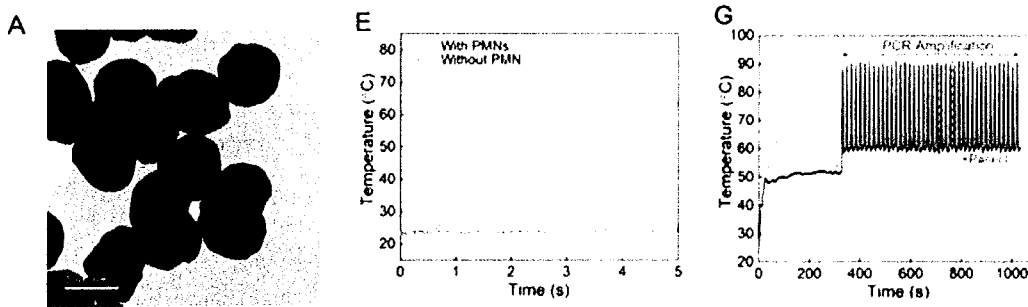
Le mélange réactionnel permettant la PPT-RTcPCR contient :

- l'échantillon humain ;
- des nucléotides en quantité équimolaire ;
- une Taq Polymérase ;
- une Transcriptase Inverse ;
- des amorces Sens et Anti-sens ;
- des PMN (nanoparticule magnétique plasmonique).

(Test de diagnostic de nouvelle génération pour la détection du virus de la dengue utilisant une stratégie RT-PCR colorimétrique plasmonique ultra rapide :Kunlun Jiang, Jung-Hoon Lee, Chanter Fung, Jingrui Wu, Congnuan Liu, hua Mi, RPV Jayanthie Rajapakse, Udeni BR Balasuriya, Yung-Kang Peng, Yun Young Go)

Document 15 : Caractérisation et performance photothermique des PMN.

Les PMN sont formées par un noyau d'oxyde de fer magnétique enfermé dans un enrobage d'or plasmonique.



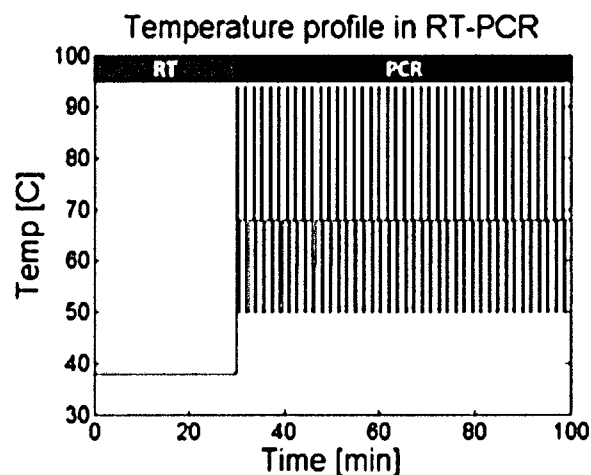
(A) Images en microscopie électronique à transmission de PMN.

(E) Profil de température de la solution avec ou sans PMN lors de l'éclairage par un LED IR.

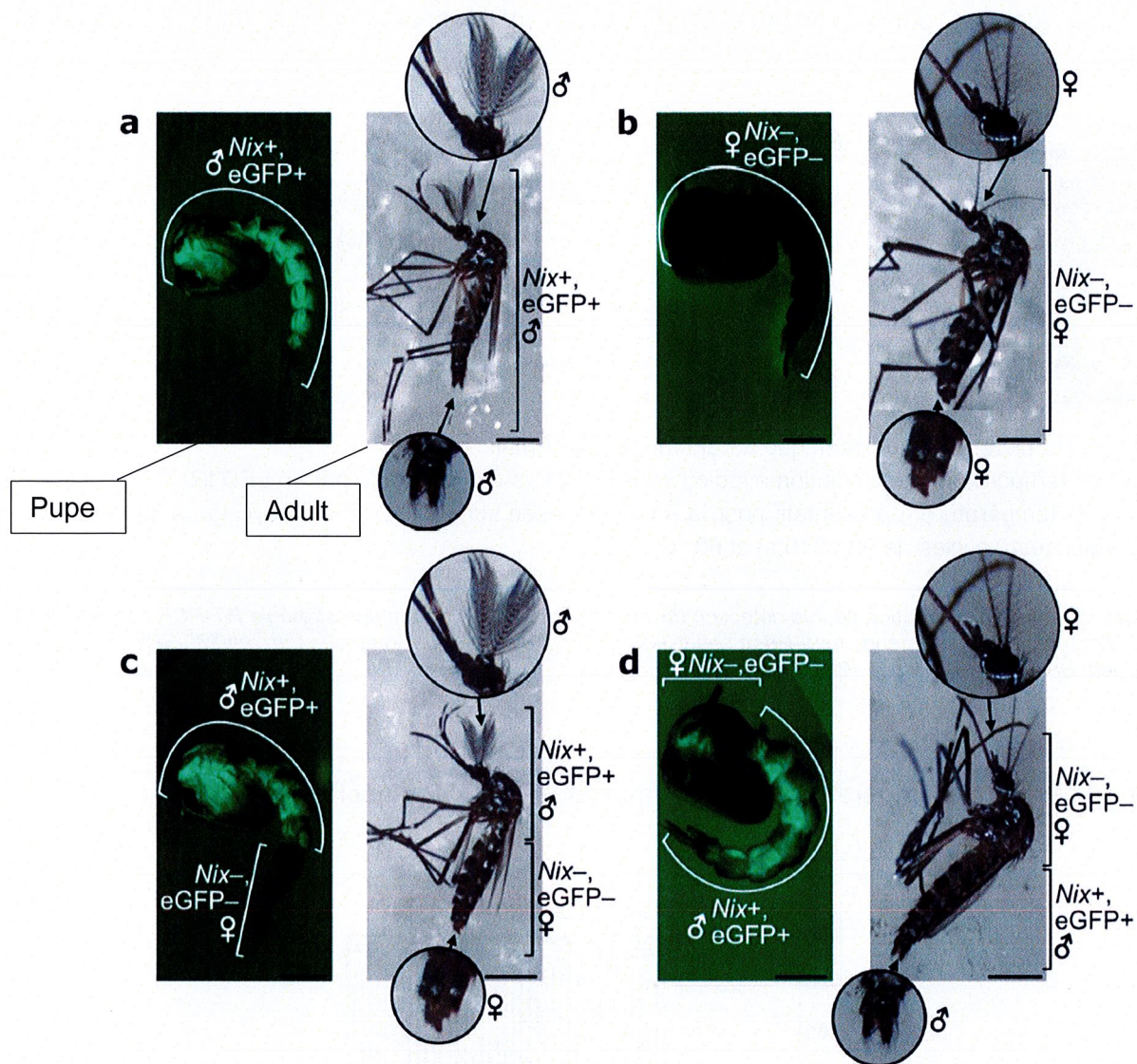
(G) Cycle de température représentatif pour la RT-PCR basée sur PPT. Le thermocyclage a commencé à 50 °C (5 min), suivi de 40 cycles de 90 °C (0 s) et 60 °C (8 s).

(Test diagnostic de nouvelle génération pour la détection du virus de la dengue utilisant une stratégie RT-PCR colorimétrique plasmonique ultra rapide : Kunlun Jiang, Jung-Hoon Lee, Chanter Fung, Jingrui Wu, Congnuan Liu, hua Mi, RPV Jayanthe Rajapakse, Udeni BR Balasuriya, Yung-Kang Peng, Yun Young Go)

Document 16 : Profil de température pour les phases RT et PCR classique



(Stochastic Analysis of the RT-PCR Process in Single-Cell RNA-Seq ; Aarón Vázquez-Jiménez and Osbaldo Resendis-Antonio)



a. Mâle transgénique ayant reçu une cassette génétique « Nix-eGFP » à l'état embryonnaire.

b. Femelle non transgénique.

c. Mâle transgénique ayant subi à l'état d'embryon, **dans sa partie postérieure** une injection d'enzyme supprimant la cassette génétique « Nix-eGFP ».

d. Mâle transgénique ayant subi à l'état d'embryon, **dans sa partie antérieure** une injection d'enzyme supprimant la cassette génétique « Nix-eGFP ».

Données :

Le gène GFP est un gène rapporteur permettant l'émission de fluorescence verte lorsque le gène Nix est exprimé.

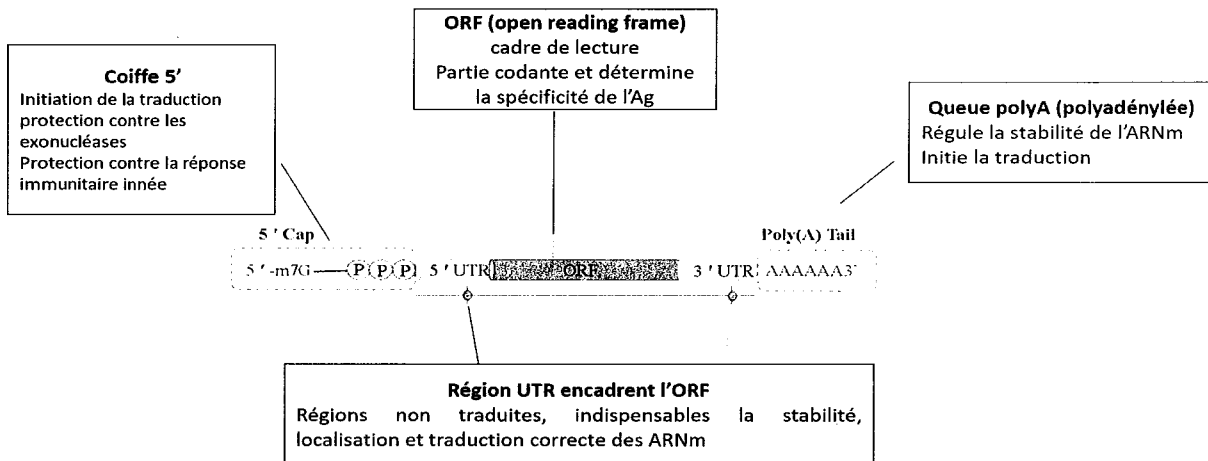
Les barres d'échelle en bas de chaque image représentent 1mm.

L'état pupa est une des étapes de la vie du moustique entre l'état larvaire et l'état adulte.

(Modifié d'après Communication Biology, « Transgenic expression of Nix converts genetic female into males and allows automated sex sorting in *Aedes albopictus* ». Célia Lutrat, Roenick P. Olmo, Thierry Baldet, Jérémy Bouyer & Eric Marois <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03165-7>)

Document 18 : Structure et composition des ARNm vaccinal

18A : Éléments composants une molécule d'ARNm



(source personnelle réalisée à partir de l'article « Preparation and Purification of In Vitro-Transcribed-mRNA-Based Molecules » : <https://encyclopedia.pub/entry/48827>)

18B : Éléments composants une molécule d'ARNm vaccinal

La production d'un ARNm vaccinal ne nécessite pas l'utilisation de cellules. La molécule d'ARNm code un antigène spécifique, stimulent l'immunité innée limitant l'addition d'un adjuvant.

Cependant, les ARNm n'ont pas tous la même durée de vie, certains sont très stables (quelques jours), d'autres instables (moins d'une heure) et particulièrement fragiles, thermolabiles, dégradés par des RNases. Ces propriétés rendent la conservation des vaccins à ARN à très basse température difficile et complexifient les étapes de purification. De plus, leur durée de vie conditionne le temps pendant lequel ils peuvent être traduits et détermine le niveau d'expression du gène correspondant.

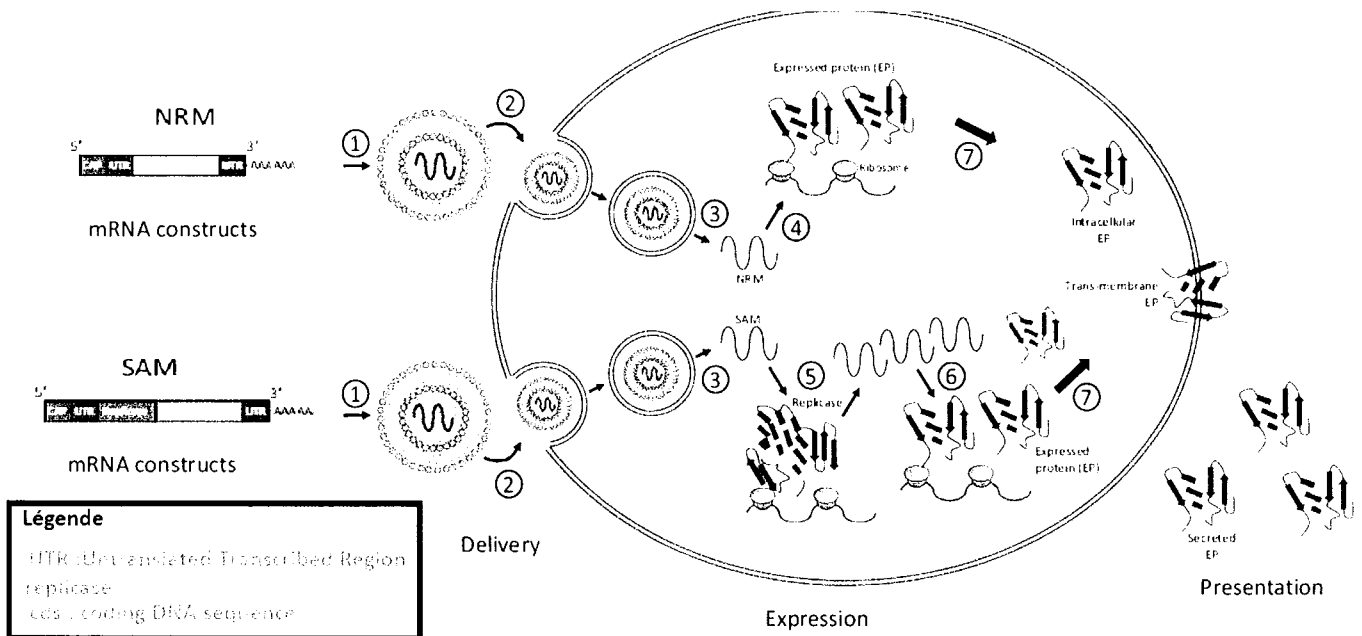
Les techniques de production, purification et conservation se sont affinées et emploient des procédés visant à améliorer la stabilité et l'efficacité des ARNm. Différentes approches ont été développées, notamment la construction d'ARN circulaires ou linéaires, la modification des bases et des régions 5' (coiffe) et 3' (longue queue poly A).

Ces approches permettent de :

- réduire l'immunogénicité de l'ARNm et donc le risque d'être reconnu comme étranger par l'hôte et détruit ;
- augmenter la stabilité de la molécule ;
- limiter la destruction ;
- induire une production plus importante de protéine antigénique.

L'ARNm est volumineux, il ne peut pas traverser les bicouches lipidiques anioniques des membranes cellulaires. De plus, à l'intérieur de l'organisme hôte, il est phagocyté par les cellules du système immunitaire inné et dégradé par les nucléases. Les nanoparticules à base de lipides sont les candidats vecteurs d'ARNm les plus avancés sur le plan clinique.

Document 19 : Les différentes formes d'ARNm vaccinal

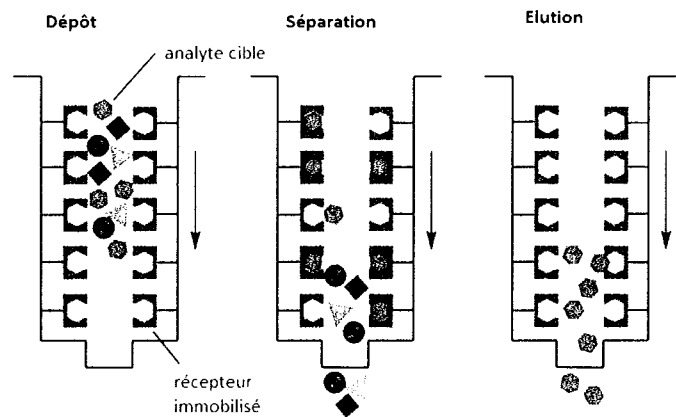


Deux catégories de constructions d'ARNm sont activement utilisées. Les constructions d'ARNm non répliqués (NRM) codent la séquence codante (CDS) et sont flanquées des régions non traduites (UTR) 5' et 3', d'une structure 5'-cap (coiffe) et d'une queue 3'-poly-(A). La construction de l'ARNm auto-amplifié (SAM) code pour des composants supplémentaires de la réplicase capables de diriger l'amplification intracellulaire de l'ARNm. (1) Dans cette illustration, le NRM et le SAM sont formulés dans des **nanoparticules lipidiques** (LNP) qui encapsulent les constructions d'ARNm pour les protéger de la dégradation et favoriser l'absorption cellulaire. (2) Les LNP sont endocytés. (3) L'ARNm est libéré dans le cytosol. (4) Les constructions de MNR localisées dans le cytosol sont immédiatement traduites par les ribosomes pour produire la protéine d'intérêt qui subit ensuite des modifications post-traductionnelles. (5) Les constructions SAM peuvent également être immédiatement traduites par les ribosomes pour produire la protéine répliquante nécessaire à l'auto-amplification de l'ARNm. (6) Les constructions d'ARNm auto-amplifiées sont traduites par les ribosomes pour produire la protéine d'intérêt, qui subit ensuite une modification post-traductionnelle. (7) Les protéines d'intérêt exprimées sont produites sous forme de protéines sécrétées, transmembranaires ou intracellulaires.

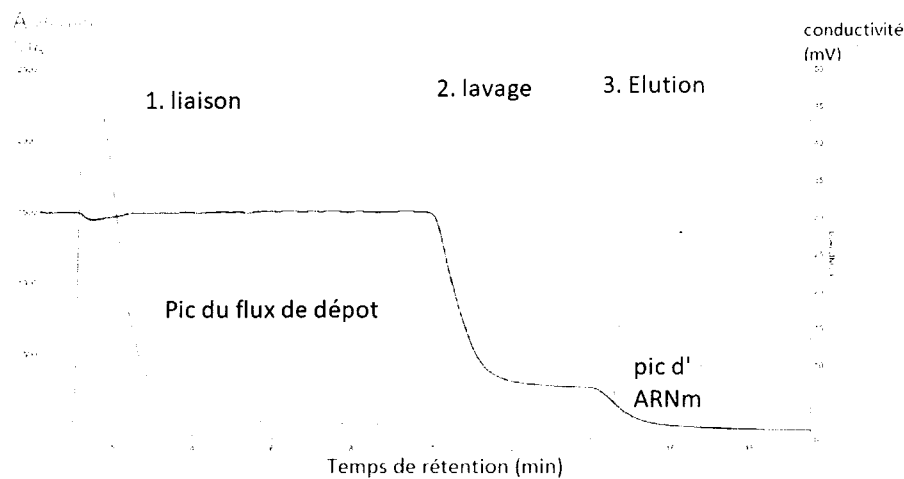
(D'après l'article Nicholas A. C. Jackson¹. *The promise of mRNA vaccines : a biotech and industrial perspective*. *npj Vaccines* (2020) 5:11 ; <https://doi.org/10.1038/s41541-020-0159-8>).

Document 20 : Chromatographie réalisée pour la purification d'un ARNm vaccinal

A - Principe



B-profil chromatographique

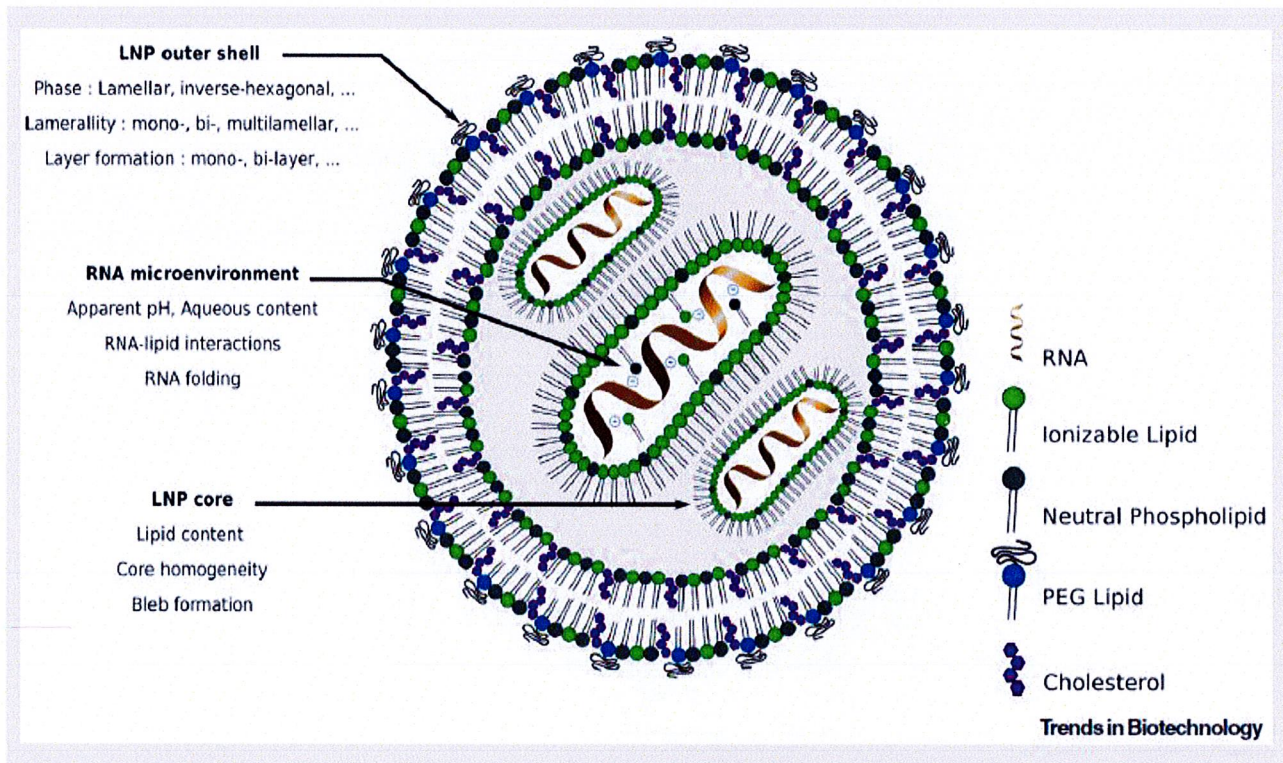


C - Conditions de la chromatographie

HPLC system:	BIA Separations PATfix™ HPLC System or equivalent
Monolithic column:	CIMmultus™ Oligo-dT, 1 mL
Mobile phases:	Binding: 50 mM Na-phosphate, 2 mM EDTA, 250 mM NaCl, pH 7.0 Washing: 50 mM Na-phosphate, 2 mM EDTA, pH 7.0 Elution: 10 mM Tris, pH 7.0
Flow rate:	1 mL/min
Sample:	IVT mix (Luc2 SNIM RNA Capping mix, 0.5 mg/mL) Sample diluted with 50 mM Na-phosphate, 2 mM EDTA, 1 M NaCl, pH 7.0 in ratio 4:1
Load volume:	0.5 mL
Loop volume:	1 mL
Detection:	UV absorbance at 260 nm

(CIM Convective Interaction Media. Purification of messenger RNA by affinity chromatography on CIMmultus™. BIA separation)

Document 21 : Structure d'un système ARN encapsulé dans une nanoparticule lipidique (ARN-LNP)



La LNP illustrée est une nanoparticule unilamellaire dense dans son cœur, avec une membrane externe constituée d'une bicouche lipidique.

Actuellement, les LNP représentent le système d'administration vaccinal le plus approprié. Les LNP les plus récentes sont composées de quatre lipides différents : un phospholipide neutre, un lipide PEG (polyéthylène glycol), du cholestérol et un lipide ionisable. Ces lipides sont fondamentaux pour assurer les propriétés de fusion avec les membranes biologiques.

Les systèmes d'administration de LNP ont des objectifs multiples dans leurs applications. Outre la stabilité durable de la protection contre la dégradation par les nucléases, ils facilitent également l'accès de l'organe ciblé, l'absorption cellulaire, et la libération de l'ARNm endosomal vers le site d'action cytoplasmique approprié.

(Quality by Design for enabling RNA platform production processes – Simon Danielorm production processes – Simon Daniel.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2022.03.012>)